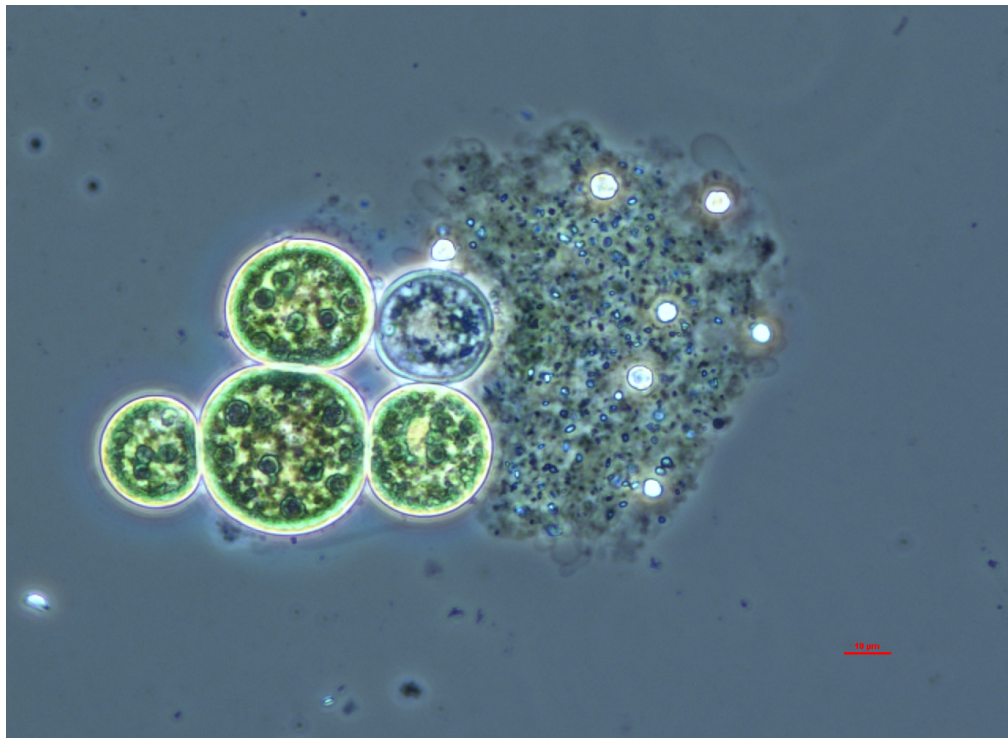


# Effekt av LED-ljus på tillväxt och pigmentproduktion hos mikroalgen *Haematococcus pluvialis*

The effect of light quality on growth and pigment production in the microalgae *Haematococcus pluvialis*

*Anna Persson*



Kandidatarbete i biologi 15 hp

Hortonomprogrammet

Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

Alnarp 2012

# **Effekt av ljuskvalitet på tillväxt och pigmentproduktion hos mikroalgen *Haematococcus pluvialis***

*Anna Persson*

**Handledare:** Malin Hultberg, SLU Hortikultur

**Examinator:** Lars Mogren, SLU Hortikultur

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** G2E

**Kurstitel:** Kandidatarbete i biologi

**Kurskod:** EX 0493

**Program/Utbildning:** Hortonom

**Utgivningsort/år:** Alnarp 2012

**Omslagsbild:** Anna Persson

**Serienamn:** Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Astaxanthin, Karotenoid, Mikroalger, *Haematococcus pluvialis*.

## Sammanfattning

I detta arbete visas att det finns en möjlighet till inducerad produktion av karotenoider med hjälp av ljus med specifik våglängd. Genom att använda LED-belysning för att belysa med en specifik våglängd sparar man både pengar och energi.

Grönalgen *Haematococcus pluvialis* har förmågan att producera ett kommersiellt intressant pigment (karotenoid), främst i avseende som kosttillskott. Karotenoiden benämns astaxanthin och har en kraftig antioxiderande verkan då den har en förmåga att eliminera fria radikaler som annars kan skada cellerna och orsaka oxidativ stress.

I detta arbete odlades *Haematococcus pluvialis* i filtrerad näringslösning från en tomatodling för att testa algens förmåga att etablera sig i osteril näringslösning. I ett parallellt försök stressades algen genom att belysas med ljus av olika våglängd för att se om det påverkade produktionen av astaxanthin. Resultaten visar att *H. pluvialis* verkar ha svårt att etablera sig på grund av långsam tillväxthastighet, som medför dåliga konkurrensmöjligheter.

Undersökning av biomassan med hjälp av spektrofotometer tyder på att lila, gul, vit och röd LED-ljusbehandling ger ett högre karotenoidinnehåll än om man endast skulle odla algerna i normalt dagsljus i växthus. Pigmenterade celler räknades också över tid och visar att andel pigmenterade celler inte nödvändigtvis stämmer överens med totalt karotenoidinnehåll i cellerna.

## Abstract

The green microalgae *Haematococcus pluvialis* has the ability to produce a carotenoid of great commercial value, called astaxanthin. The production of the carotenoid is induced when the alga is under abiotic stress, in some cases due to high light intensity.

In this study, *H. pluvialis* was cultivated in a filtered but non-sterile nutrient solution from greenhouse cultivation. This was done in order to examine the potential of the microalgae to grow in used nutrient solution, a waste product from nurseries. In parallel experiments *H. pluvialis* was exposed to different light quality by using LED-light to see if this could enhance the production of astaxanthin. By spectrophotometrical based analysis it was concluded that the purple, yellow, white and red LED-light had the highest absorption on carotenoids. The competitiveness of *H. pluvialis* was found to be low when it was cultured in non-sterile nutrient solution.

# Innehållsförteckning

<b>1. Introduktion</b>	<b>6</b>
1.1 Problembeskrivning och syfte	6
1.1.2 <i>Haematococcus pluvialis</i>	6
1.1.3 Karotenoider	7
1.1.4 Astaxanthin	9
1.2 Frågeställning	11
<b>2. Material och metod</b>	<b>11</b>
2.1 Mikroorganismer	11
2.2 Försöksupplägg	12
2.2.1 Analys av <i>H. pluvialis</i> tillväxt i näringslösning från växthus	13
2.2.2 Analys av tillväxt och färgförändringar LED-behandling	13
2.2.3 Mätning av karotenoidinnehåll med spektrofotometer	14
<b>3. Resultat</b>	<b>15</b>
3.1 Odling av <i>H. pluvialis</i> i osteril näringslösning	15
3.2 <i>H. pluvialis</i> under påverkan av LED	16
3.2.1 Procentuell fördelning över orange och gröna celler	17
3.2.2 Total densitet	20
3.3 Absorbans och pigmentinnehåll	22
<b>4. Diskussion</b>	<b>22</b>
<b>5. Slutsats</b>	<b>26</b>
<b>6. Litteraturlista</b>	<b>27</b>

# Introduktion

## 1.1 Problembeskrivning och syfte

Vi har i dagens samhälle stora problem med utsläpp av förorenat vatten bl. a. från jordbruket. Detta vatten, som innehåller näringsämnen, hittar sin väg ner till grundvattnet eller direkt vidare ut i vattendrag, vilket i sin tur leder till övergödning av sjöar och hav.

Det hade varit bra om man kunde ta till vara alla dessa näringsämnen, och vad som hade varit ännu bättre är om man dessutom skulle kunna tjäna på det rent ekonomiskt genom att få en värdefull biprodukt.

Försöket är en utvidgning utav ett pågående försök vid område Hortikultur på SLU i Alnarp. Huvudförsöket utgörs av att man i returvatten från en växthusodling försöker att se om det finns möjlighet att odla mikroalger för att reducera näringsmängden och samtidigt producera kommersiellt intressanta metaboliter (nedbrytningsprodukter). Mikroalgerna som valts (*Haematococcus pluvialis* och *Chlorella vulgaris*) har en förmåga att producera specifika sekundära metaboliter, som för oss är kommersiellt viktiga. Syftet bakom försöket är att man, som växthusodlare, ska kunna använda sitt returvatten för odling av dessa mikroalger. En parallell undersökning görs också för att se om det finns en möjlighet att påverka produktionen av dessa metaboliter genom att belysa algerna med ljus av specifik våglängd. I detta arbete har fokus legat på *Haematococcus pluvialis* då det är denna som kan producera astaxanthin.

### 1.1.2 *Haematococcus pluvialis*

Grönalgen *Haematococcus pluvialis* livscykel består av fyra olika faser: I den första fasen sker endast vegetativ tillväxt, detta kallas den gröna fasen. Det är i denna fas som algen är som mest känslig för intensiv ljusstrålning. Det är i den andra fasen som algerna utvecklas till omogna cystor, i tredje fasen börjar dessa cystor mogna och producera karotenoider. Denna cellform kallas även för aplanospor. I fas fyra kan den nu mogna cystan gå över till att börja föröka sig igen, vilket innebär att små rörliga celler ”föds” och i sin tur kan påbörja samma

livscykel (Elliot, 1934). De rörliga cellerna, som har två flageller (en utväxt som gör cellen mobil), finns bara i fas ett och fas två.

De vegetativa gröna cellerna som finns i fas ett innehåller en stor andel klorofyll och protein, för att i cystfasen (fas två) få en ökad biosyntes och inlagring av karotenoider samtidigt som nedbrytningen av klorofyll och protein ökar (Kakizono et al., 1997).

*H. pluvialis* är en så kallad mixotrof grönalga. Detta innebär att den har möjlighet att tillväxa i en lösning med ytterst lite näring så länge det finns en närvaro av ljus, samtidigt som den kan överleva i mörker under förutsättningen att näring finns att tillgå. För att cellerna ska gå från fas två till fas tre krävs tillsatts av näring t.ex. i form av acetat (Kakizono et al., 1997). Om man sedan tillsätter järn, i form av  $\text{Fe}^{2+}$ , så får man en tydlig ökning av biosyntesen av karotenoider i cellerna. Om man byter till nytt medium så kan man få cystorna att producera nya mobila celler (med flageller). På så sätt kan man få en livscykel för *H. pluvialis* på 14 dagar (Kakizono et al., 1997). Detta kan vara bra att ha i åtanke om man vill få mycket biomassa så snabbt som möjligt.

Då man nuförtiden odlar *H. pluvialis* för produktion av astaxanthin så brukar man använda en tvåstegsprocess. I det första steget, då cellerna är gröna, är de känsliga för ljus och miljöförändringar. På grund av detta behöver tillgången till näringsämnen och pH kontrolleras och ljusinstrålningen vara relativt låg. I det andra stadiet stressar man algerna genom att öka ljusinstrålningen, minska på tillgången av kväve och fosfor, och även höja temperaturen något. Man kan även saltstessa algerna. Problemet med att minska kvävetillgången är att då minskar tillväxten av cellerna, vilket i sin tur ger mindre biomassa (Abalde et al., 2001). Denna stress leder till inducerandet av haematocyststadiet (fas två till fyra) i algernas liv, det är stadiet i vilket de kan börja producera astaxanthinet. För att sedan kunna skörda biomassan brukar man centrifugera algerna och torka dem (Buckingham et al., 2011).

### 1.1.3 Karotenoider

Karotenoider finns i alla fotosyntetiserande växter, samt några mikroorganismer, och har en viktig roll för att distribuera ljus men fungerar även som ett skydd. Karotenoider är pigment som absorberar solljus i vissa ljusspektra. De fungerar även som ett skydd för cellerna mot

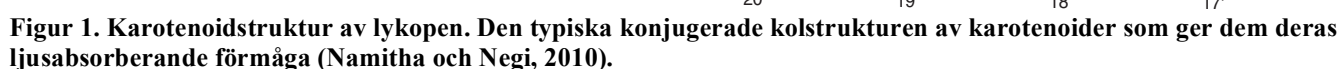
oxidativ stress genom att eliminera fria radikaler. Fria radikaler är mycket reaktiva molekyler som uppstår då syret omsätts i celler ([www.slv.se](http://www.slv.se), 2011). Karotenoider ser även till att cellen inte utsätts för ett överskott av ljus (Namitha och Negi, 2010), vilket kan ske då växter utsätts för direkt solljus under en längre period. Vissa karaktäristiska färger på djur, som laxens färg, kommer från just karotenoider. Djur har ingen möjlighet att själva syntetisera karotenoider, vilket innebär att de måste få i sig de via kosten. Karotenoider har traditionellt sett länge varit aktuella i kosten även till oss människor. Detta för att det har visat sig att de har en förebyggande och i vissa fall direkt läkande effekt på sjukdomar som cancer, hjärt- och kärlsjukdomar, artrit samt några neurologiska sjukdomar (Amaro et al., 2011) som till exempel Parkinsons- och Alzheimers sjukdom. Karotenoider spelar också en stor roll i bevarandet av livsmedel då de har en antioxiderande verkan. Det har även visat sig att de passar bra till användning i kosmetika- och läkemedelsindustrin (färgämnen etc.).

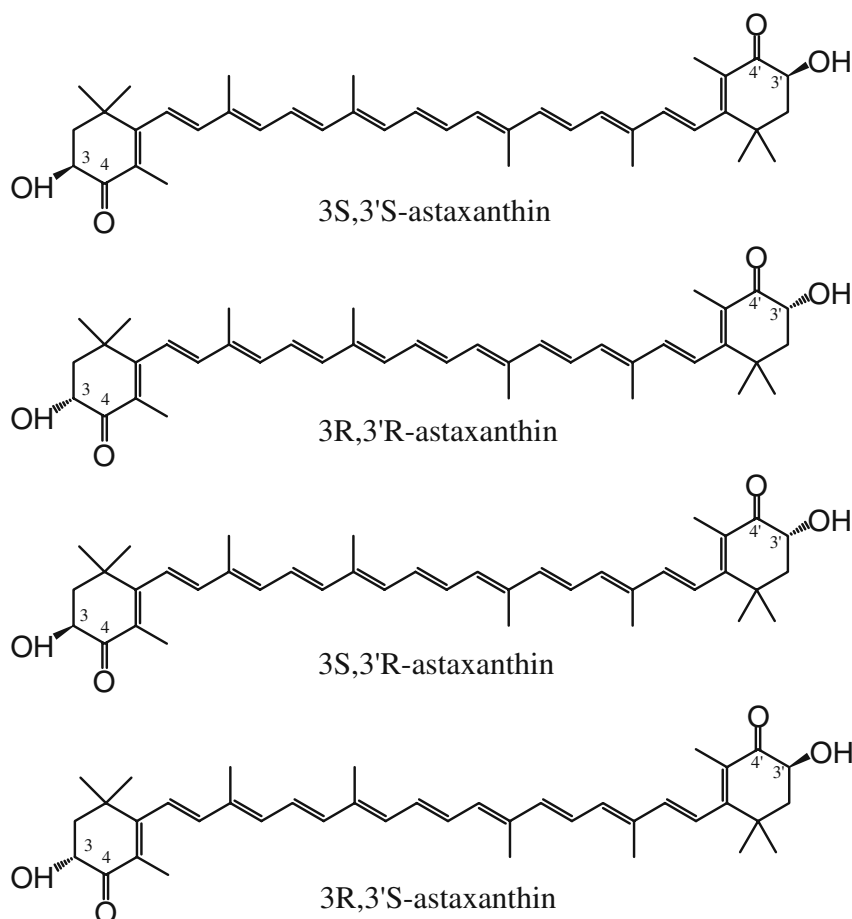
Karotenoider tillhör gruppen terpenoidpigment, vilka har sitt kemiska ursprung från 40-kols polyenkedjor. Man brukar skilja på primära och sekundära karotenoider. De primära har strukturer som krävs för organismens överlevnad och hittas i de fotosyntetiserande organen i cellerna. De sekundära karotenoiderna produceras oftast av mikroalger i samband med miljörelaterad stress (näringsbrist, hög ljusintensitet etc.) (Eonseon, 2003). Karotenoider har på grund av alla dubbelbindningar en konjugerande uppbyggnad, vilket innebär att kolen i molekylen delvis delar på elektronerna. Elektronerna är på så sätt fria att röra sig mellan kolatomerna, vilket minskar energin som krävs för att ändra molekylen. Det är denna struktur som ger de speciella ljusabsorberande och antioxidativa egenskaperna som karotenoider har (del Campo et al., 2007).

Beroende på hur karotenoiderna är uppbyggda rent kemiskt kan de delas in i två olika grupper, karotener och xanthofyller. Generellt gäller att i karotener endast är uppbyggda av kol och väte, medan xanthofyllernas sammansättning bygger på en förekomst av väte i form av en OH-grupp (del Campo et al., 2007). Alla xanthofyller kan produceras av växter (t.ex. violaxanthin, lutein, zeaxanthin och neoxanthin) och kan även produceras av grönalger (Chang et al., 2003).

Då xanthofyller är lipofila (fettälskande) molekyler hittar man dem i cellmembranen, i det man kallar tylakoidmembranen. De sekundära karotenoiderna finns istället bl. a. i blåsor avgränsade från cellens inre omslutna av ett lipidlager (lipidvesiklar) eller i den vätska som omsluter cellorganellerna (cytosolen) (Grossman et al., 1995).







**Figur 2. Strukturen av de tre trans-formerna av astaxanthin som existerar. De två understa är identiska (alltså räknas de som en) (Buckingham et al., 2011).**

Karotenoider har under årens lopp ökat i efterfrågan bland annat på grund av att man funnit att de har en stark antioxiderande verkan, vilket är förknippat med ett sundare leverne tack vare dess kapacitet att skydda cellen mot oxidativ stress. År 2006 var uppskattat marknadsvärde till över US\$1000 miljoner dollar (Del Campo et al., 2007).

I dagens läge produceras det mesta astaxanthinet på syntetisk väg. Detta innebär stora kostnader. Marknadspriset på syntetiskt framtaget astaxanthin ligger idag på US\$2000-2500/kg (Milledge, 2011), vilket motsvarar runt 14000 svenska kronor per kilo.

Ett problem är att kemiskt framtaget astaxanthin kommer från petrokemikalier, som är en slaggprodukt från oljeindustrin. Detta gör att de globalt blivit förbjudna att användas som kosttillskott för människor, och får endast användas i aquakulturer som kosttillskott till laxar (Li et al., 2011).

Tidigare studier (Li et al., 2011) har visat att om man istället använder mikroalgen *H. pluvialis* för att producera detta ämne, som redan uppkommer naturligt i deras biosyntes (som sekundär metabolit), så skulle astaxanthinet bli mycket billigare. Man skulle dessutom på

detta sätt få det naturliga astaxanthinet och kan då använda det direkt som ett kosttillskott till människor.

Li et al. (2011) gjorde en studie av hur detta skulle kunna fungera i praktiken. De kom fram till att om man startade upp en anläggning med en kapacitet på 900 kg astaxanthin/år så skulle priset på astaxanthin bli så låga som US\$ 718/kg, vilket motsvarar ungefär 1/3 av dagens pris på syntetiskt framtaget astaxanthin.

Kan man dessutom på något sätt stressa *H. pluvialis* till ökad produktion av astaxanthin och öka torrvikten så skulle priset sjunka ännu mer.

## 1.2 Frågeställning

- Kan *H. pluvialis* tillväxa i näringslösning från växthusodling?
- Kan man genom inverkan av LED-belysning stressa mikroalgen *H. pluvialis* till ökad produktion av den kommersiellt viktiga karotenoiden astaxanthin?

Undersökningen bestod av två moment, en litteraturstudie kring astaxanthin och ett praktiskt försök. Det praktiska momentet gick ut på att odla *H. pluvialis* och studera om exponering för olika LED-ljus kan stressa mikroalgen *H. pluvialis* till ökad produktion av astaxanthin.

## 2. Material och metod

### 2.1 Mikroorganismer

Mikroorganismen som användes i försöket var *Haematococcus pluvialis* CCAP34/7 som importerats från Skottland; från CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) under SAMS (The Scottish Association for Marine Science). Information kring stammen finns på [http://www.ccap.ac.uk/strain\\_info.php?Strain\\_No=34/7](http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=34/7).

Initial odling skedde i växthus i Alnarp som ligger i Skåne. Försöket inleddes i början av april och algerna odlades i Z8 (NIVA 1976) ett medium som är speciellt framtaget för att passa grönalgers behov. Det tillsatta ljuset (400 W HPS-lampor) mätt i fotosyntetiskt aktiv strålning

var  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  för *H. pluvialis* där ljuset reducerades av en skuggväv (AB Ludvig Svensson, Kinna, Sweden). Detta eftersom *H. pluvialis* är känslig för ljus under den gröna tillväxtfasen.

Genomsnittlig instrålning mot växthuset under försöksperioden var  $1850 \pm 570 \text{ Wh/m}^2$  per dag. Temperaturen i växthuset ställdes in på  $20^\circ\text{C}$ , men beroende på vädret så kunde det hända att temperaturen steg med några grader. Dagslängden begränsades till 18 h dag och 6 h natt.

## 2.2 Försöksupplägg

Tillväxtförsöken i näringslösning genomfördes enligt Ardal, (2012). Fyra e-kolvar á 500 ml användes (se bilder 4-6) och i dessa tillsattes 200 ml av näringslösning från växthusodling som filtrerats genom en  $10 \mu\text{m}$  väv. Näringslösningen bestod av cirkulationsvatten från en tomatodling, där sammansättningen av makronäringsämnen var kalium (K) 387 mg/l, kvävenitrat ( $\text{NO}_3$ ) 383 mg/l, kalcium (Ca) 335 mg/l, magnesium (Mg) 67,0 mg/l, fosfor (P) 33,9 mg/l och natrium (Na) 22,4 mg/l. Mikronäringsämnena i näringslösningen bestod av klor (Cl) 13,9 mg/l, kisel (Si) 6,64 mg/l, järn (Fe) 2,15 mg/l, zink (Zn) 0,500 mg/l, mangan (Mn) 0,358 mg/l, bor (B) 0,330 mg/l, koppar (Cu) 0,169 mg/l, molybden (Mb) 0,083 mg/l och aluminium (Al) 0,033 mg/l.

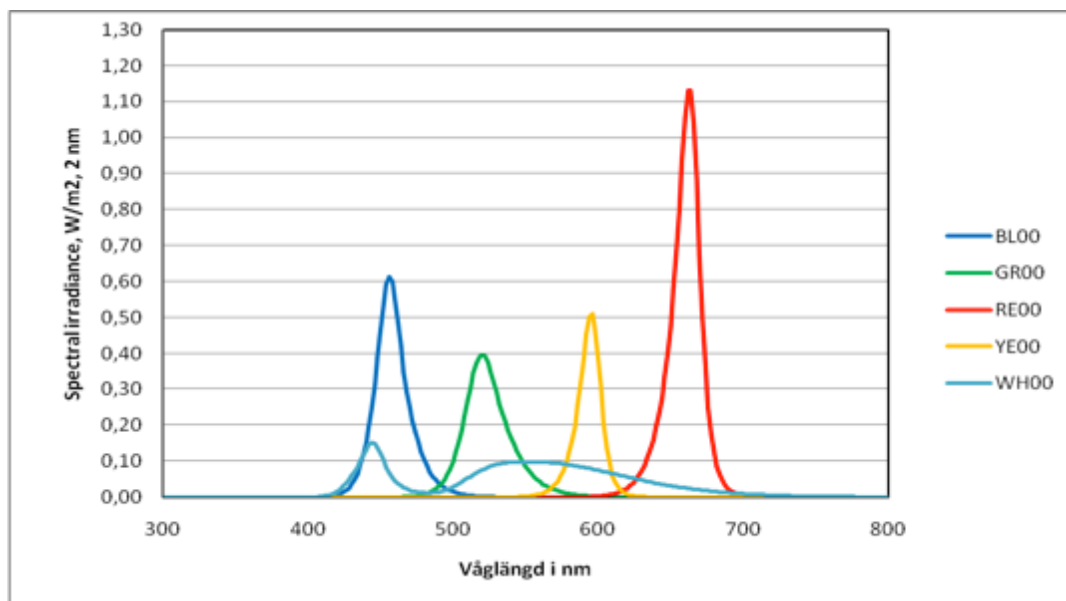
Odlingen av mikroalgen för LED-försöket gjordes i Z8 (NIVA 1976).

Då tillväxten av *H. pluvialis* nått en exponentiell fas (efter 10 dagar), flyttades algerna från växthuset in i ett mörkt rum med olika LED-belysningar.

I försöket utsattes *H. pluvialis* för 7 olika ljusbehandlingar; rött, gult, grönt, blått, lila, vitt och en behandling användes som referens och lämnades därför kvar i växthuset under en skuggväv.

Försöket genomfördes med tre replikat och varje replikat bestod av 5 ml algsuspension

De olika ljuskällorna placerades i hyllvagnar. För minskad spridning och för att få maximal reflektion i kamrarna så kläddes dessa in i plast med vit insida och svart utsida. Våglängderna hos de använda ljuskällorna sträckte sig från 400 nm till 700 nm. Fem av behandlingarnas våglängder (blå, grön, gul, röd och vit) finns illustrerade i figur 3.



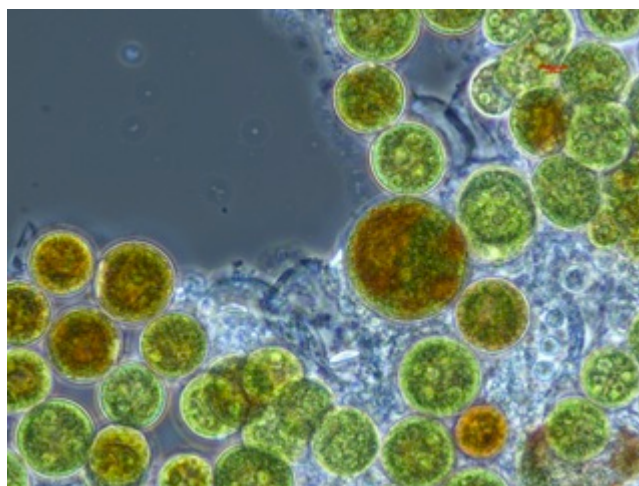
Figur 3. Våglängdsfördelningen hos fem av de olika LED-armaturerna som användes i försöket. BL00 = blå armatur, GR00=grön armatur, RE00=röd armatur, YE00=gul armatur och WH00=vit armatur (Månsson 2010).

### 2.2.1 Analys av *H. pluvialis* tillväxt i näringslösning från växthus

Analysen av försöket med *H. pluvialis* i osteril näringslösning gjordes i ljusmikroskop. Prover togs från samtliga e-kolvar 17 dagar efter start (19:e april), och proverna undersöktes visuellt för att bedöma *H. pluvialis* konkurrenskraft under påverkan av andra mikroorganismer. Större mikroorganismer fotograferades för att senare, om möjligt, identifieras. Då försöket avslutades centrifugerades lösningarna för bestämning av torrsvikt.

### 2.2.2 Analys av tillväxt och färgförändringar LED-behandling

Vid försökets start mättes näringslösningens celldensitet. Detta upprepades därefter var 7:e dag, då *H. pluvialis* har förhållandevis långsam tillväxt. Tillväxten mättes genom att cellerna räknades i en bürkerkammare under ljusmikroskop. Färgförändringar undersöktes både makroskopiskt, visuellt, och mikroskopiskt genom att antalet färgade celler räknades i ljusmikroskop. Även detta utfördes var 7:e dag.



**Figur 3. *Haematococcus pluvialis* i olika tillväxtfaser. De orangae/röda skiftningarna indikerar påbörjad karotenoidbildning. I försöket räknades de celler som var klart orange. Egen bild.**

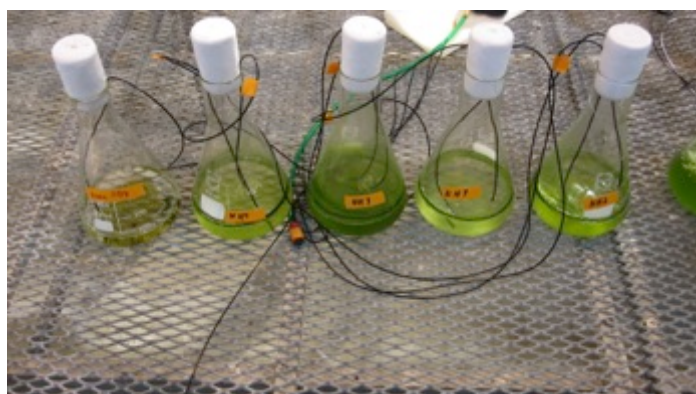
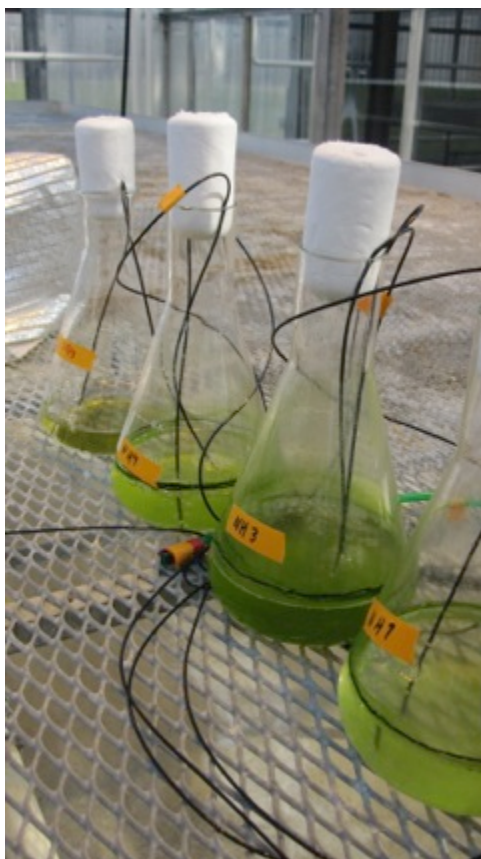
### 2.2.3 Mätning av karotenoidinnehåll med spektrofotometer

Efter att algerna räknats kontinuerligt i 4 veckor mättes den totala koncentrationen av klorofyll a, b och karotenoider med en spektrofotometrisk metod enligt Lichtenthaler & Welburn (1983). Cellerna centrifugerades ner (3000 g under 15 min) och pelleten frystes för att fördärva cellstrukturen. Därefter blandades pelleten med 1,3 ml aceton (80 %). Efter att aceton tillsatts hanterades proverna så långt det var möjligt i mörker. Proverna inkuberades över natt (12 h) i mörker och noll grader (isbad). Därefter behandlades proverna i ett (ultrasonic) bad i 90 s och centrifugerades sedan i 5 min på 10 000 rpm. Därefter pipetterades proverna till kyvetter för mätning av absorbans i spektrofotometern. Absorbansen mättes på 3 olika våglängder, 470 nm, 647 nm och 663 nm. Beräkningar av pigment gjordes efter följande formler (Lichtenthaler & Welburn, 1983):

$$\text{Klorofyll } a = 12.21 * A_{663} - 2.81 * A_{647}$$

$$\text{Klorofyll } b = 20.13 * A_{647} - 5.03 * A_{663}$$

$$\text{Karotenoid} = (1000 * A_{470} - 3.27 * C_a - 104 * C_b) / 229$$



Figur 4-6. Försöksupplägg för odlingen av *H. pluvialis* i äkta näringslösning. Egna bilder.

### 3. Resultat

#### 3.1 Odling av *H. pluvialis* i osteril näringslösning

Odlingen av *H. pluvialis* i näringslösning från växthusodling innehöll mycket olika mikroorganismer. Vid mikroskopisk undersökning av de fyra olika e-kolvarna hittades en stor mångfald av mikroorganismer. I två av kolvarna fanns amöbaliknande organismer av större storlek (se figur 7). I en av e-kolvarna var det extremt mycket rörelse, och organismerna var mycket små.



Figur 7. Amöbaliknande organism funnen i de osterila näringslösningarna. Egen bild.



I samtliga e-kolvar hittades celler som liknade *H. pluvialis*. En del hade färgskiftningar i mitten, vilket kan tyda på produktion av karotenoider.

I det försök (Ardal, 2012) där *H. pluvialis* från start odlades i näringslösning som inte använts i odling blev torrvikten något högre än i det försök där *H. pluvialis* ympades in i osteril filtrerad näringslösning. I första försöket blev medelvärdet 0,45 mg torrvt/ml och i det andra 0,33 mg torrvt/ml.

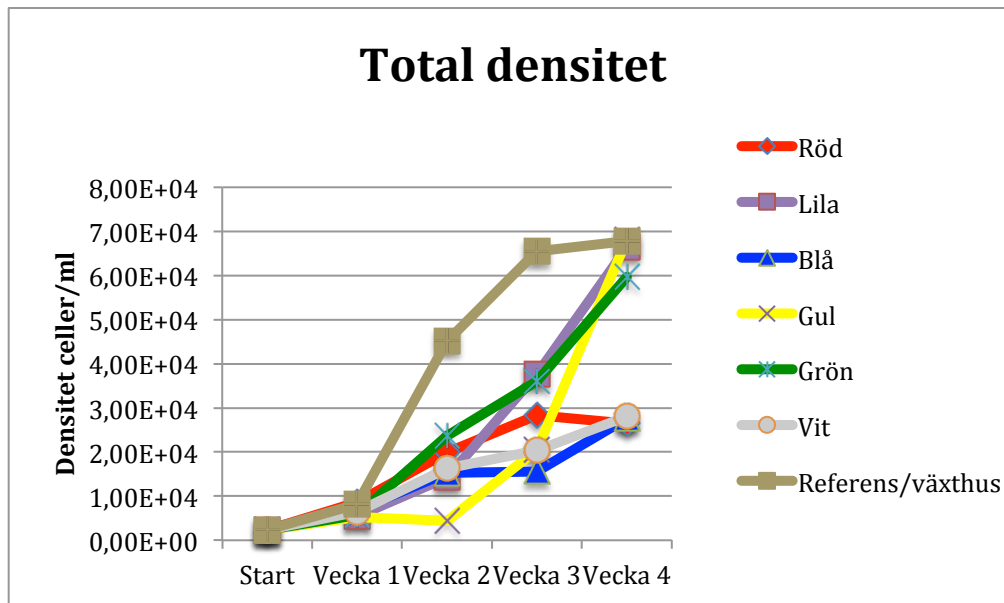


Figur 8. E-kolvar med äkta näringslösning. E-kolv längst t.v. innehåller endast Z8 samt en kultur av *H. pluvialis* (egen bild).

### 3.2 *Haematococcus pluvialis* under påverkan av LED

Den största tillväxten av *H. pluvialis* skedde i referensbehandlingen som lämnats kvar i växthuset (se figur 9). Även de lila och gröna LED-behandlingarna hade en hög celldensitet. Den röda, blåa och vita behandlingen hade alla ungefär samma densitet.

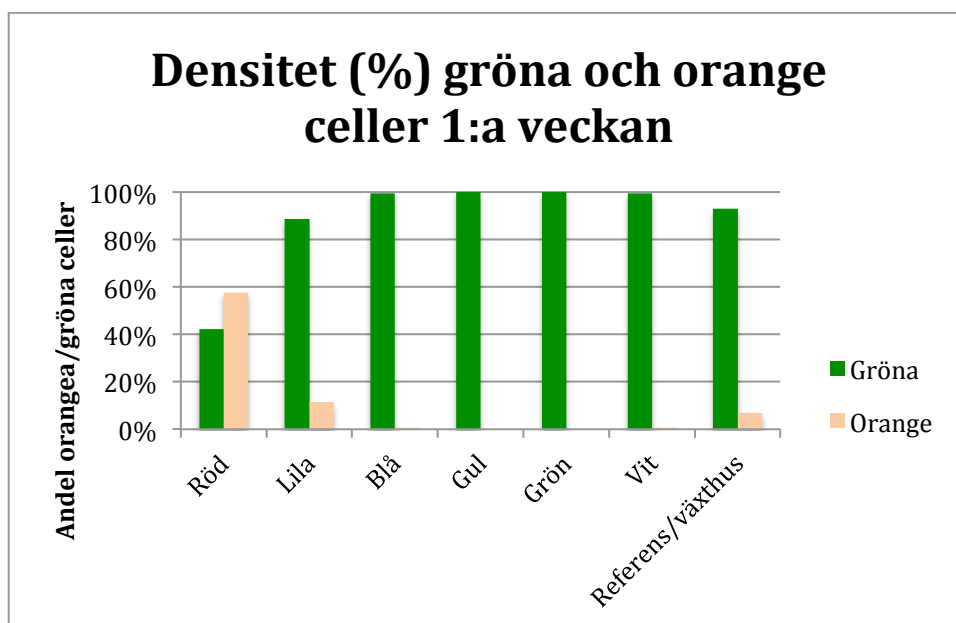




Figur 9. Den totala celldensiteten presenterad i form av medelvärde i samtliga behandlingar under försöksperioden.

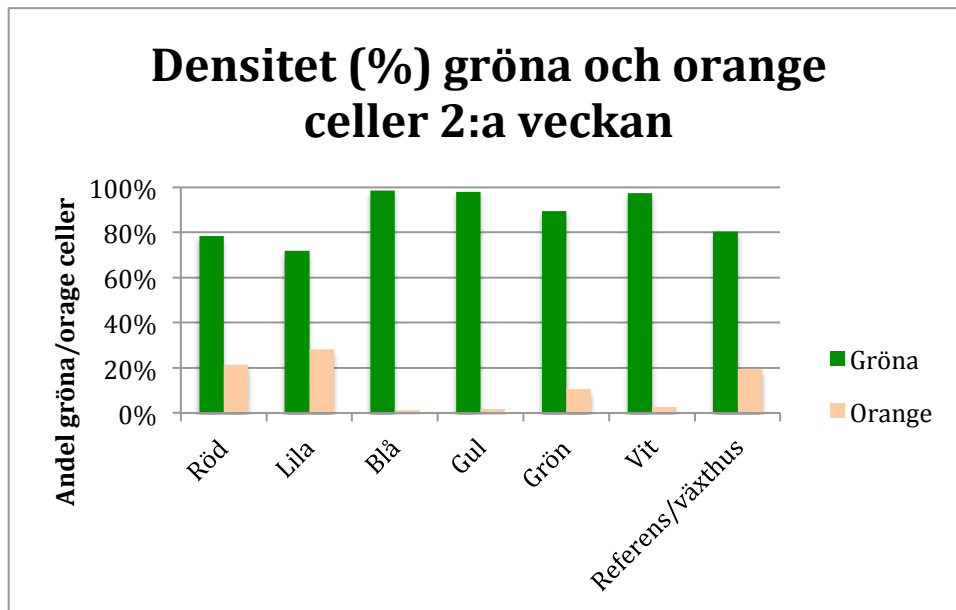
### 3.2.1 Procentuell fördelning över orange och gröna celler

Efter vecka ett såg fördelningen av gröna och orange celler ut enligt figur 10. En tydlig utstickare är den röda behandlingen som procentuellt har fler orange celler än gröna (ca 60 % orange). Även den lila, blå och vita behandlingen har en del orange celler, referensbehandlingen likaså. Gul och grön behandling hade i princip 100 % gröna celler.



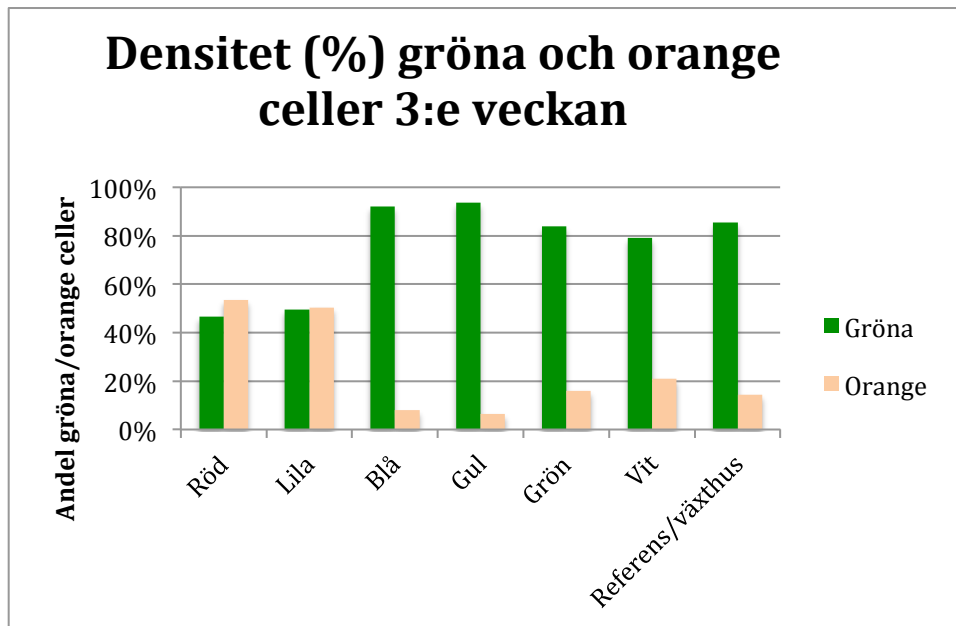
Figur 10. Procentuell fördelning av gröna och orange celler efter första behandlingsveckan.

Efter andra veckan hade samtliga behandlingar börjat få orange celler. Referensbehandlingen samt lila och röd behandling hade ungefär lika stor andel orange celler (runt 20 %). Blå, gul och vit behandling hade minst orange celler, se figur 11.



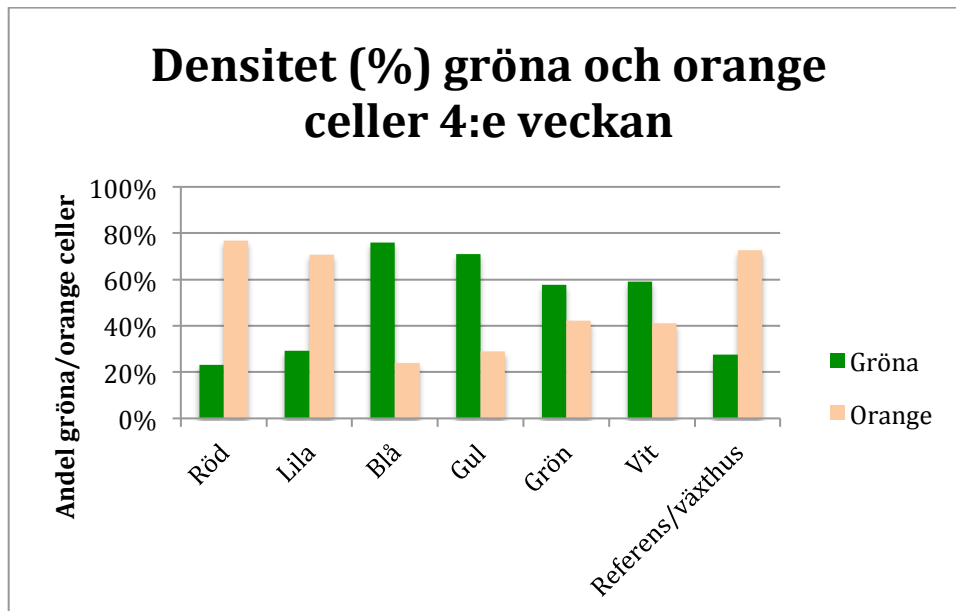
Figur 11. Densiteten av gröna samt orange celler procentuellt sett efter två veckors behandling.

Den tredje veckan hade den röda och lila behandlingen mycket likartade sammansättningar, som bestod av ca 50 % orange celler. Den röda behandlingen hade något större andel orange celler. De andra behandlingarna skiljde sig inte märkvärt mycket och bestod av minst 80 % gröna celler. Se figur 12.



**Figur 12.** Den procentuella fördelningen av orange och gröna celler efter tre veckors behandling.

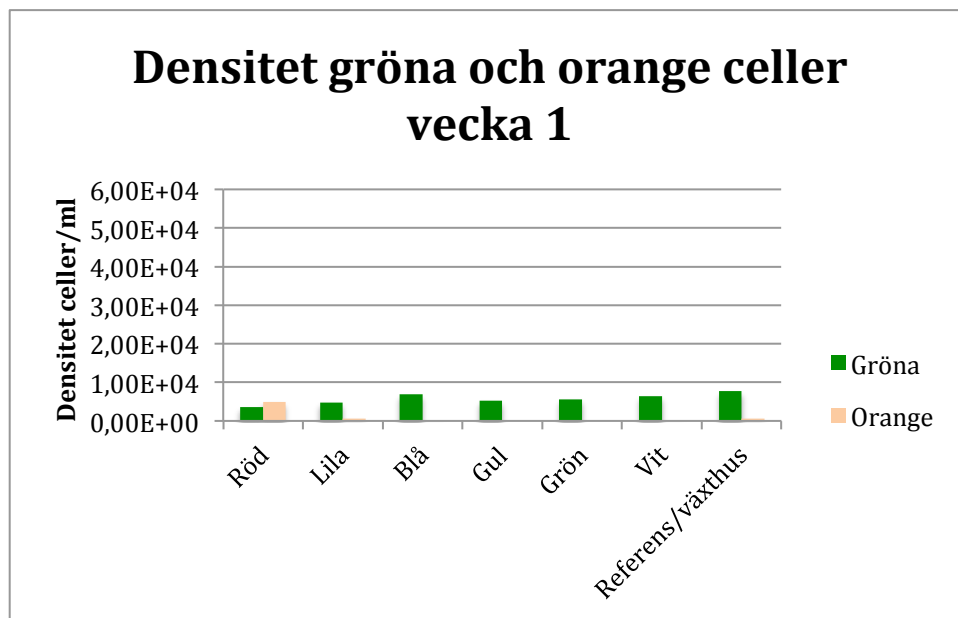
Efter slutmätningen, efter fyra veckor, hade röd, lila och referensbehandlingen samtliga högre andel orange celler än gröna. Blå behandling hade procentuellt sett minst andel orange celler (ca 20 %) av alla behandlingar, se figur 13.



**Figur 13.** Slutmätning av samtliga behandlingar. Procentuell fördelningen av orange och gröna celler.

### 3.2.2 Total densitet

Första veckan var tillväxten relativt låg och den enda behandlingen som tydligt visade orange celler var den röda. Total densitet var överlag densamma i samtliga behandlingar, se figur 14.

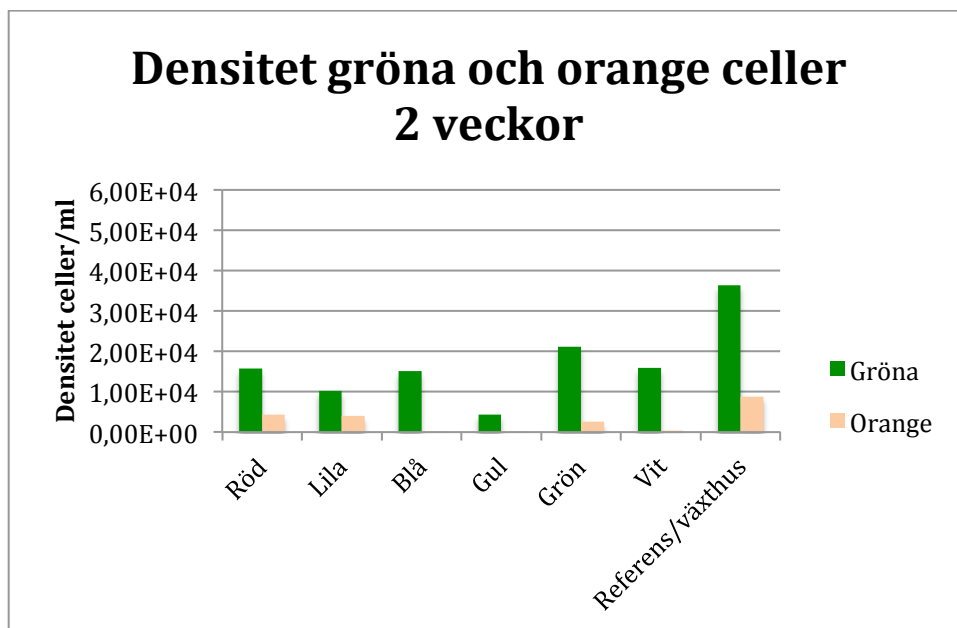


Figur 14. Total densitet i celler/ml av orange och gröna celler räknat i bürkerkammare under ljusmikroskop.

Efter två veckors behandling såg resultatet av cellräkningen ut enligt figur 15.

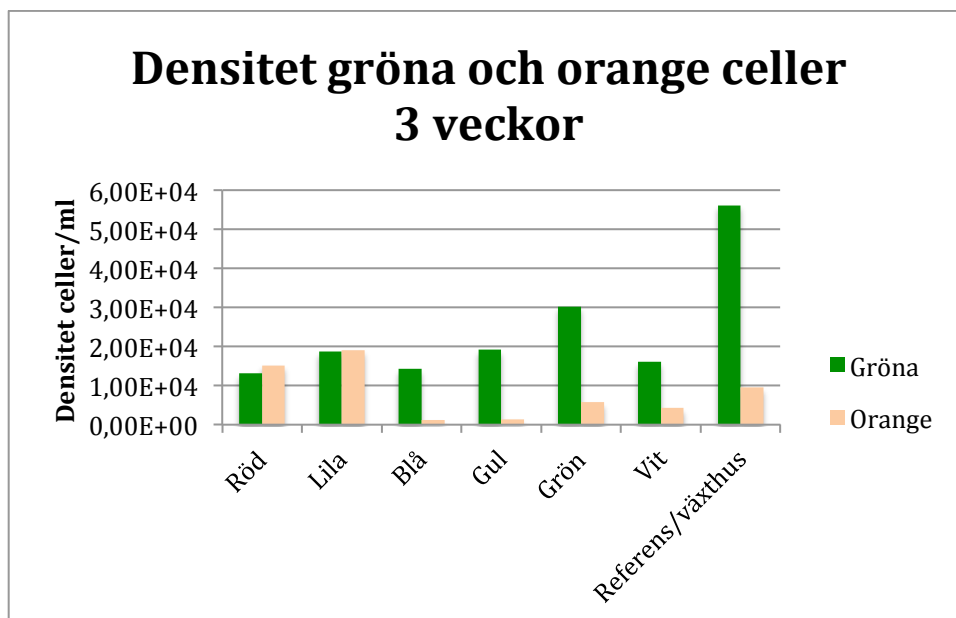
Referensbehandlingen hade högst totaldensitet, medan gul behandling hade mycket låg.

Lila och röd behandling hade ungefär lika stor densitet orange celler.



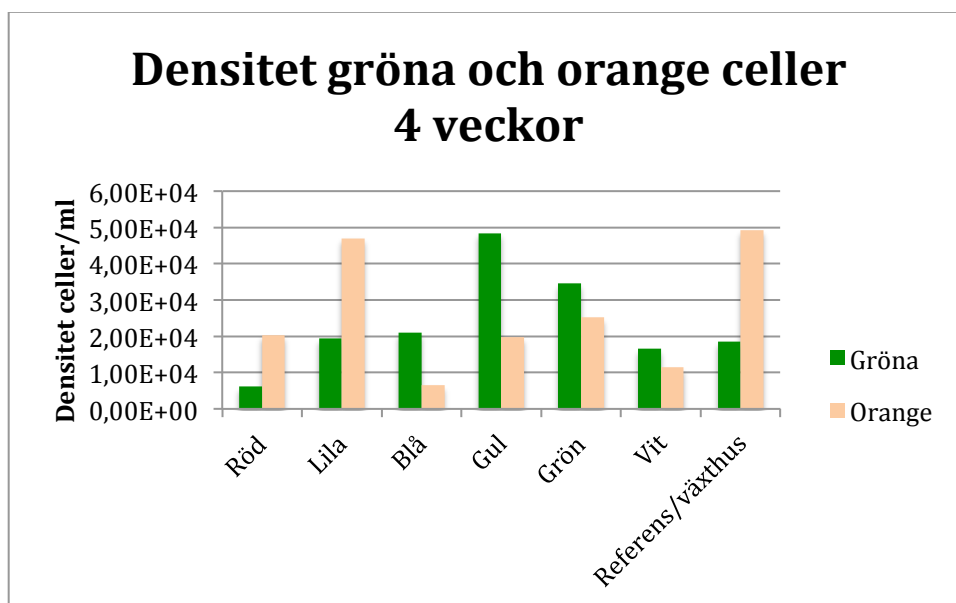
Figur 15. Total densitet av gröna och orange celler efter två veckors behandling mätt i celler/ml.

Efter tre veckors behandling hade referensbehandlingen klart högst totaldensitet. Den lila och röda behandlingen hade liknande sammansättning med ungefär halva densiteten bestående av orange celler. Blå och gul behandling hade minst antal orange celler, se figur 16.



Figur 16. Densiteten mätt i celler/ml av orange och gröna celler på samtliga behandlingar vecka tre.

Efter fyra veckor hade den lila behandlingen ungefär samma sammansättning som referensbehandlingen med mer än dubbelt så mycket orange celler som gröna. Röd, vit och blå behandling hade lägst total celldensitet, se figur 17.



Figur 17. Densiteten av gröna och orange celler efter fyra veckors behandling mätt i celler/ml.

### 3.3 Absorbans och pigmentinnehåll

Efter fyra veckors led-ljusbehandling mättes absorbansen av innehållet i cellerna på samtliga behandlingar. Efter uträkning enligt tidigare nämnd formel (Lichtenthaler & Welburn, 1983) blev resultaten enligt tabell 1. Den lila behandlingen sticker ut mest med tydligt högst värden på karotenoider, klorofyll a och klorofyll b.

**Tabell 1. Uppmätt absorbans mätt på tre olika våglängder, 470 nm, 647 nm och 663 nm samt totalmängder baserat på de ekvationer som tidigare beskrivits.**

	470 nm	647 nm	663 nm	Karotenoid µg/ml	Klorofyll a µg/ml	Klorofyll b µg/ml
<b>Växthus*</b>	0,023±0,010	0,019±0,022	0,008±0,003	-0,056	0,043	0,343
<b>Blå</b>	0,015±0,003	0,005±0,001	0,006±0,003	0,036	0,063	0,063
<b>Grön</b>	0,013±0,003	0,004±0,001	0,005±0,002	0,033	0,050	0,049
<b>Gul</b>	0,072±0,049	0,021±0,015	0,037±0,029	0,204	0,398	0,233
<b>Lila</b>	0,144±0,031	0,039±0,005	0,076±0,007	<b>0,434</b>	<b>0,822</b>	<b>0,403</b>
<b>Röd</b>	0,041±0,003	0,005±0,001	0,007±0,001	0,152	0,074	0,059
<b>Vit</b>	0,062±0,021	0,020±0,009	0,033±0,009	0,161	0,346	0,230

\* replikaten som lämnades i växthuset kan endast ses som referens då miljön (ljus, temp etc.) var helt annorlunda i jämförelse med de som varit i LED-rummet.

## 4. Diskussion

Förutsättningar för att kunna odla *Haematococcus pluvialis* i cirkulationsvatten i exempelvis ett växthus är att det är enkelt och relativt billigt. Det bör vara så att odlaren i fråga lätt ska kunna ympa in en stam av *H. pluvialis* i näringslösningen, och efter det ska den i princip sköta sig själv. Ett stort problem här är att *H. pluvialis* inte verkar vara speciellt konkurrenskraftig. Detta innebär att den hade haft svårt att konkurrera ut andra eventuella mikroorganismer som oftast förekommer i näringslösningar. Alternativet är att försöka filtrera bort så mycket som möjligt innan inympning.

I försöket med odlingen av *H. pluvialis* i osteril näringslösning från en tomatodling, så filtrerades först lösningen genom ett filter med storleken 10µm. Detta för att ta bort större

mikroorganismer och eventuella betande djurplankton. Trots det hittades en hel del främmande mikroorganismer i lösningarna, exempelvis amöbaliknande organismer (se figur 7, sidan 15). Dessa skulle lätt kunna konkurrera ut *H. pluvialis* endast genom att ha en snabbare tillväxthastighet och på så vis ta all näring och plats.

I jämförelse mellan torrvikterna fick försöket med endast *H. pluvialis* (Ardal, 2012) en något större torrsvikt (mg/ml). Detta är lite missledande då det i försöket med osteril lösning förekom många andra större mikroorganismer. Resultatet kan bero på att man lyckats filtrera bort det mesta, och att *H. pluvialis* här inte haft den näring som krävts för optimal tillväxt. I Ardals försök (2012) användes också ett medium som är speciellt framtaget för att passa algers behov på näring (Z8).

Genom att titta på diagrammet (se figur 9, sidan 17) över den totala celldensiteten så kan man se att den var störst i den lila och gula behandlingen. Även i referensbehandlingen är det hög densitet. Om man sedan jämför detta med tabell 1 över den uppmätta absorptionsen i samtliga replikat kan man även här se att de stämmer överens med diagrammet över den totala celldensiteten (se figur 9). Både den gula och den lila visar högst halt av karotenoider, vilket indikerar att det här har skett störst produktion av astaxanthin. Referensbehandlingen har inte speciellt högt värde på varken klorofyll a/b eller karotenoider. Värdet på karotenoider har fått ett negativt värde möjligen på grund av för liten mängd testat material. Formlerna för beräkning av klorofyll a/b samt karotenoider är framtagna för växtmaterial, vilket gör det svårt att få bra värden då man testat på så pass lite biomassa.

Alla behandlingar förutom blå och grön har fått ett högre värde på karotenoider än vad referensbehandlingen har. De som egentligen går att jämföra är de som har ungefär samma densitet, dvs. referens/gul/röd och lila. Av dessa så har lila högst värde på karotenoidinnehåll, därefter gul, röd, referens och sist grön. Då referensen har högst densitet men nästan lägst värde på karotenoider tyder detta på att det här har skett minst produktion av astaxanthin. Vit, grön och blå behandling har alla fått en relativt låg tillväxt (se figur 9). Detta indikerar att *H. pluvialis* inte tillväxer fullt ut under påverkan av ljus med våglängder från ca 400-550 nm. Den vita behandlingen ger ett bredare spektra, då vitt ljus är en "blandning" av alla färger. Just den vita behandlingen har även förhållandevis hög effekt i jämförelse med de andra behandlingarna. Detta ger mer värme, vilket i sin tur troligtvis påverkar tillväxten av *H. pluvialis*. För mycket stress i form av för hög ljusintensitet kan även leda till fotoinhibition i

cellerna (Lee, 1999; Park and Lee 2000), vilket kan leda till störningar när fotosyntesen ska fortgå.

Makroskopisk undersökning av replikaten indikerade att det skett störst tillväxt och produktion av astaxanthin i referensbehandlingen (som lämnats kvar i växthuset) samt den röda behandlingen. Dock såg de orange cellerna i båda behandlingarna mer jämnorange ut här, än i jämförelse med t ex. de lila och gula behandlingarna. I dessa fanns mer en tydlig ”kärna” av tydligt pigment (karotenoider). Dessa förekom även i referensbehandlingen, dock inte i samma utsträckning. Undersökningen av absorbansen indikerar att så var fallet; de små cellerna i referensbehandlingen var möjligen orange utan att innehålla just karotenoider. Men vad det skulle kunna vara som visar orange färg utan att vara karotenoider är oklart.

För att kunna mäta absorbans på lösningar så förutsätter detta att man har pigment lösta i själva ämnet man vill testa, som i detta fall var aceton. Ett problem som uppkom då detta skulle göras var att *H. pluvialis* cellväggar, då de kommit in i aplanosporstadiet och börjat biosyntesen av astaxanthin, var svåra att sönderdela. Så det är möjligt att alla pigment inte kunde extraheras ur cellen, vilket skulle kunna ge ett felaktigt resultat. Ett mer effektivt sätt att sönderdela cellväggarna krävs därför. Man skulle kunna använda sig av någon slags homogenisator.

Man skulle kunna ta fram ett fungerande system för produktion av astaxanthin med mikroalgen *H. pluvialis*, möjligen enligt den princip som Li et al., provade år 2011. Eftersom efterfrågan på astaxanthin idag är så pass stor, och utbudet relativt litet, så kan priserna fortfarande hållas höga. Resultatet av satsningar på naturlig produktion av astaxanthin skulle därför kunna leda till att priset på marknaden sjunker drastiskt, och i sin tur kanske detta skulle kunna leda till att produktionen på syntetisk produktion byts ut överhuvudtaget. Detta är en trolig utväg, också på grund av att det krävs petrokemikalier för den syntetiska produktionen (Li et al., 2011), vilket i sin tur kommer från fossila bränslen. Kommer det ett sätt att både få astaxanthin och samtidigt slippa de fossila bränslena så kommer man som det ser ut idag vara ganska snabba att skippa de sistnämnda.

Då *H. pluvialis* är en mikroalg som kräver ljusstress för produktion av astaxanthin så behövs mycket energi i form av ljuskällor. En massproduktion skulle då bli förhållandevis dyr då priset på energi bara stiger som det ser ut i dagens läge.

En annan möjlig lösning, som dock är mindre trolig, är att man ökar utbudet av astaxanthin och fortfarande kan hålla samma höga pris.



*Haematococcus pluvialis* ger en relativt låg torrsvikt vilket kan vara ett problem om man vill börja någon slags massproduktion. Man får se till att maximera avkastningen genom en kontrollerad produktion i avseende av näring/stress. Ett möjligt steg för att effektivisera produktionen hade varit om det fanns en möjlighet till genmodifiering av algen för ökad avkastning av astaxanthin.

Ett stort problem i detta försök var det låga antalet replikat som användes. Det blir svårt att få en jämn och säker bild på hur det egentligen är om man endast använder sig av dels få replikat och dels små replikat (5 ml). Därför så hade nästa steg i försöket varit att utöka det och göra det i större omfattning så man på så vis får mer biomassa.

Försökets gjordes i ett LED-rum där det samtidigt gjordes ett annat försök, vilket innebar att brunnarna med 5 ml algssuspension fick trängas med växter i varje kammare. I början av försöket var detta inget problem, men i takt med att växterna blev större så blev även problemet större. Det gav skuggning och en del problem då prover skulle tas för analys. Ett separat rum med LED-belysning hade varit det ultimata. På så vis behöver man inte fundera över huruvida alla behandlingar fick lika mycket ljus.

Luftomrörning av kulturen skulle kunna förbättra tillväxten/produktion av astaxanthin då detta ger att fler celler mer jämt exponeras för ljuset, och självskuggning förhindras. Dock får man överväga om det är aktuellt att satsa på en mer avancerad anläggning (med pumpar etc.), då risken är att det inte blir ekonomiskt försvarbart.

Det var svårt att räkna celler under ljusmikroskop, och det ledde till värden som möjligen inte var exakta. Man skulle kunna få en siffra på celltäthet genom att göra ett optiskt densitetstest i en spektrofotometer istället (vilket gjordes i Ardals arbete, 2012). Även till detta hade det behövts mer biomassa och då också större prover.

Beräkningen av celldensiteten blev ett större problem då *H. pluvialis* även har en tendens att växa i klumpar. Detta gav stor plats för en stor variation mellan räkningarna (vilket leder till stora standardavvikelser, vilket i sin tur leder till mindre trovärdighet av försöket). Detta kan vara anledningen till att den totala densiteten minskat från en vecka till en annan. Fler replikat är ett sätt att öka trovärdigheten av resultaten.

## 5. Slutsats

Att odla *H. pluvialis* i osteril näringslösning från en växthusodling kan bli svårt då dess tillväxthastighet är relativt låg. Detta gör att den får svårt att etablera sig snabbt och konkurreras då lätt ut av andra mikroorganismer.

Det tycks vara möjligt att få en ökad produktion av karotenoiden astaxanthin om man stressar mikroalgen *Haematococcus pluvialis* med hjälp av LED-belysning. Resultaten pekar på att lila skulle vara den bästa färgen för detta. Gul, lila, vit och röd behandling hade alla högre absorbans och halt av karotenoider än vad referensbehandlingen i växthuset visade. Detta betyder att det kanske inte är ultimat att odla dessa alger i returvatten från växthusodlingar med endast naturlig instrålning för just produktion av astaxanthin.

## 6. Litteraturlista

- Abalde, J., Cid, A., Franqueira, D & Orosa, M., 2001. *Carotenoid accumulation in Haematococcus pluvialis in mixotrophic growth*. Biotechnology Letters 23: 373–378,.
- Amaro H.M., Guedes A.C. och Malcata F.X., 2011. *Microalgae as Sources of Carotenoids*. Marine Drugs 9, 625-644.
- Ardal, E., 2012. *Odling av mikroalger inom trädgårdsnäringen- Kan mikroalger som producerar kommersiellt intressanta ämnen tillväxa i använd näringslösning från växthusodling?* <http://stud.epsilon.slu.se> Kandidatarbete vid LTJ, SLU.
- Borza, T., Durnford, D.G., Ishida, K-I., Keeling, P., Koziol, A.G., Lee, R.W., 2007. *Tracing the Evolution of the Light-Harvesting Antennae in Chlorophyll a/b-Containing Organisms*. Plant Physiology. 4, 1802-1816
- Buckingham, J., Gassel, S., Hümbelin, M., Jin, C., Sandmann, G., Schewe, H., Schmidt, I., Schrader, J. 2011. *Biotechnological production of astaxanthin with Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 555-571.
- Chang, M., Eonseon, J., Hyund, S.M., Lee, H.K., Polle, J.E.W., 2003 *Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application*. Microb. Biotechnol. 13, 165-174.
- Del Campo, J.A., García-González, M., & Guerrero, M.G., 2007. *Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives*, Appl Microbiol Biotechnol 74:1163–1174.
- Durnford, D.G., Neilson, J.A.D., 2010. *Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes*. Photosynth, 106, 57-71.
- Elliot, A.M., 1934. *Morphology and life history of Haematococcus pluvialis*. Arch. Protistenk. 82, 250-272.

Frank, H.A. & Polivka, T., 2010. *Molecular Factors Controlling Photosynthetic Light Harvesting by Carotenoids*. Accounts of Chemical Research. 43, 1125-1134.

Grossman, A.R., Bhaya, D., Apt., K.E., Kehoe, D.M., 1995. *Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution*. Annu. Rev. Genet. 29, 231-288.

Kakizono, T., Kobayashi, M., Kurimura, Y., Nishio, N., and Tsuji, Y. 1997, *Morphological changes in the life cycle of the green alga Haematococcus pluvialis*, Journal of fermentation and bioengineering vol. 84, No. 1, 94-97.

Lee C.-G. 1999. *Calculation of light penetration depth in photobioreactors*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 4, 78-81.

Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., Wang, G., 2011. *An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of Haematococcus pluvialis*. Biotechnology Advances 29, 568-574.

Lichtenthaler, HK & Wellburn, AR., 1983 *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*. Biochemical Society Transactions 11, 591 - 592.

Livsmedelsverket, 2011. Besökt 2012-05-28.

<http://www.slv.se/sv/grupp1/Mat-och-naring/Vad-innehaller-maten/Vitaminer/Fria-radikaler/>

Milledge J. 2011. *Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review*. Rev Environ Sci Biotechnol, Vol 10. 1, 31-41.

Månsson, S., 2010. *LED-ljusets inverkan på tillväxt och utveckling hos tomatplantor, Solanum lycopersicum L.* <http://stud.epsilon.slu.se> Kandidatarbete vid LTJ, SLU.

Namitha, K.K. & Negi P.P. 2010. *Chemistry and Biotechnology of Carotenoids*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 50, 728-760.

NIVA 1976. *Estimation of algal growth potential*. - Norwegian Inst. for Water Research, Publ. D2-25.

Park K.-H. and Lee C.-G. 2000. *Optimization of algal photobioreactors using flashing lights*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 5, 186-190.

Turujman SA, Wamer WG, Wei RR, Albert RH (1997) *Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin*. J AOAC Int 3, 622–632.